

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **2001181632 A**

(43) Date of publication of application: **03.07.01**

(51) Int. Cl

C09K 15/34
A21D 13/08
A23L 1/30
A23L 3/3472
A61K 35/78
A61P 39/06

(21) Application number: **2000312312**

(22) Date of filing: **12.10.00**

(30) Priority: **14.10.99 JP 11293040**

(71) Applicant: **NISSHIN OIL MILLS LTD:THE**

(72) Inventor: **KUNO NORIYASU**
MATSUMOTO MIHO

(54) **ANTIOXIDANT**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an antioxidant having strong anti-oxidizing effect, high safety to the human body and a wide use.

SOLUTION: This antioxidant comprises an extract of an olive plant (except leaf, hereinafter the same) as an active ingredient. The extract can be obtained by

extracting an olive plant and/or a product obtained in an olive oil production process with water and/or an organic solvent. Further, the extract is concentrated and/or fractioned/purified to improve the effect. Especially, the extract has an anti-oxidizing effect such as preservation stability improving effect and anti-oxidizing effect in vivo such as prevention of various diseases and anti-aging effect.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

THIS PAGE LEFT BLANK

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-181632
(P2001-181632A)

(43) 公開日 平成13年7月3日(2001.7.3)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 0 9 K 15/34		C 0 9 K 15/34	
A 2 1 D 13/08		A 2 1 D 13/08	
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	B
3/3472		3/3472	
A 6 1 K 35/78		A 6 1 K 35/78	C
審査請求 未請求 請求項の数19 O L (全 18 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-312312(P2000-312312)
(22) 出願日 平成12年10月12日(2000.10.12)
(31) 優先権主張番号 特願平11-293040
(32) 優先日 平成11年10月14日(1999.10.14)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000227009
日清製油株式会社
東京都中央区新川1丁目23番1号
(72) 発明者 久野 憲康
神奈川県横須賀市小矢部2-21-22-208
(72) 発明者 松本 美保
神奈川県逗子市新宿1-6-36

(54) 【発明の名称】 抗酸化剤

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、強い抗酸化効果を有し、人体に対する安全性が高く、さらには用途の広い抗酸化剤を提供することを目的とする。

【解決手段】 オリーブ植物（葉を除く。以下同じ）から得られる抽出物を有効成分とする抗酸化剤に関する。該抽出物はオリーブ植物および／またはオリーブ油製造工程で得られる生成物を水および／または有機溶媒で抽出処理して得ることができ、更に抽出物を濃縮処理および／または分画・精製処理することで効果を向上させることができる。特に、保存安定性向上効果等の酸化防止効果や、各種疾病予防や抗老化効果等の生体内抗酸化効果を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 オリーブ植物（葉を除く。以下同じ。）から得られる抽出物を有効成分とする抗酸化剤。

【請求項 2】 抽出物がオリーブ植物および／またはオリーブ油製造工程で得られる生成物を、水および／または有機溶媒で抽出処理して得られたものである請求項 1 に記載の抗酸化剤。

【請求項 3】 抽出物が、更に濃縮処理および／または分画・精製処理されたものである請求項 2 に記載の抗酸化剤。

【請求項 4】 オリーブ植物から得られる抽出物を有効成分とする酸化防止剤。

【請求項 5】 保存安定性向上効果を有する請求項 4 に記載の酸化防止剤。

【請求項 6】 抽出物がオリーブ植物および／またはオリーブ油製造工程で得られる生成物を、水および／または有機溶媒で抽出処理して得られたものである請求項 4 または 5 に記載の酸化防止剤。

【請求項 7】 抽出物が、更に濃縮処理および／または分画・精製処理されたものである請求項 6 に記載の酸化防止剤。

【請求項 8】 オリーブ植物から得られる抽出物を有効成分とする生体内抗酸化剤。

【請求項 9】 各種疾病予防効果および／または抗老化効果を有する請求項 8 に記載の生体内抗酸化剤。

【請求項 10】 抽出物がオリーブ植物および／またはオリーブ油製造工程で得られる生成物を、水および／または有機溶媒で抽出処理して得られたものである請求項 8 または 9 に記載の生体内抗酸化剤。

【請求項 11】 抽出物が、更に濃縮処理および／または分画・精製処理されたものである請求項 10 に記載の生体内抗酸化剤。

【請求項 12】 水に対して易溶性である請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の抗酸化剤、酸化防止剤または生体内抗酸化剤。

【請求項 13】 水または含水親水性有機溶媒に、一部または全部が溶解した状態にあることを特徴とする請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の抗酸化剤、酸化防止剤または生体内抗酸化剤。

【請求項 14】 請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の抗酸化剤、酸化防止剤または生体内抗酸化剤を各種製品に配合することを特徴とする、該抗酸化剤、酸化防止剤または生体内抗酸化剤の使用法。

【請求項 15】 前記製品が飲食物である請求項 14 に記載の使用法。

【請求項 16】 請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の抗酸化剤、酸化防止剤または生体内抗酸化剤を内服させることを特徴とする、該抗酸化剤、酸化防止剤または生体内抗酸化剤の使用法。

【請求項 17】 オリーブから得られる抽出物を抗酸化

剤として使用する方法。

【請求項 18】 オリーブから得られる抽出物を酸化防止剤として使用する方法。

【請求項 19】 オリーブから得られる抽出物を生体内抗酸化剤として使用する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、オリーブ（*Olea europaea* L.）植物から得られる抽出物を含有する抗酸化剤に関し、抗酸化効果、特に製品の保存安定性の向上効果等の優れた酸化防止効果や、各種疾病予防効果や抗老化効果等の優れた生体内抗酸化効果を有する抗酸化剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】油脂、とりわけ不飽和脂肪酸を含む油脂は酸化されやすく、品質劣化、栄養性・機能性低下の大きな原因となる。不飽和脂肪酸の中でもリノール酸、リノレン酸およびアラキドン酸は必須脂肪酸として栄養素として重要な役割を果たしている。また近年、EPA、DHA など高度不飽和脂肪酸の生理活性に注目され、これらを含む多くの飲食物などが上市されている。しかしこれらの不飽和脂肪酸は極めて酸化安定性に欠けるため、抗酸化剤の添加が必要となるが、長期間保存に有効な抗酸化剤は今のところ無いのが現状である。

【0003】生物は、酸素を利用することによって生存に必要なエネルギーを効率的に得ている。しかしながら、このようなエネルギー代謝のうち酸素が水に変換される過程で、中間体として活性酸素種が生じる。一般にこの活性酸素種としては、マクロファージの刺激などによって放出されるスーパーオキシド、放射線の被爆などによって生成されるヒドロキシラジカルなどが知られている。これらの活性酸素種は過度の放射線や紫外線の照射、化学物質やタバコの摂取等の外的誘因と虚血再還流、炎症、ストレス、老化等の内的要因が原因となって生成される。このようにして生体内で過剰に生成された活性酸素種は、一般に化学的反応性が高く、生体内で隣接する脂質や核酸、蛋白質等の成分と容易に反応し、さまざまな疾病に繋がる酸化的障害をもたらす。活性酸素種の一つであるスーパーオキシドは、さまざまな疾病と深い関わりがあることが明らかにされており、例えば動脈中の LDL は、スーパーオキシドによって酸化されて泡沫細胞を形成し、動脈硬化の原因を発生する。また放射線の照射によりもたらされるヒドロキシラジカルの産生は、発癌などの深刻な障害を生体に与える。（Halliwell B. and Gutteridge M. C., *Biochem. J.* 219, 1-14, (1984)）。

【0004】このような活性酸素種の生体に対する毒性が明らかになるにつれ、これらを効率的に消去する活性を有する活性酸素種消去物質等の抗酸化剤は、生体内ま

たは食品や医薬品、農業等に含まれる成分の酸化的劣化の防御剤として有用であり、食品産業、特に水産加工品、健康食品、栄養食品のほか、医薬品・農業分野や化粧品分野において実利的な利用が期待されているものである。

【0005】近年、抗酸化剤に限らず、化学合成品からなる食品添加物の安全性の問題に対する消費者の意識も高まっており、例えば、BHA（ブチルヒドロキシアニソール）やBHT（ブチルヒドロキシトルエン）等の化学合成抗酸化剤は、その使用が避けられる傾向にある。また、他の抗酸化剤も、植物油由来のトコフェロール類など油溶性（非水溶性）のものが多く、実際の使用に際しては制約を受けることが多い。

【0006】このような中、これまでさまざまな抗酸化剤が、主に天然物由来の原料から抽出され、その応用が検討されている。例えばスーパーオキシド消去活性を有するものとして酵素蛋白であるスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）等が、ヒドロキシラジカル消去活性を有するものとしてマンニトール、トリプトファン、ギ酸等が挙げられている（例えば、大柳善彦「SODと活性酸素種調節剤-その薬理的作用と臨床応用」、第224～228頁、日本医学館、1989年）。

【0007】しかしながら、SODは酵素タンパクであるため、熱などに対する安定性が乏しく、また経口投与した場合、投与した酵素のほとんどは消化・排泄されてしまい、その実効力は極めて低かった。また、ヒドロキシラジカルを効率的に消去できる実用的なヒドロキシラジカル消去剤は現在のところ少ない。従って、これら抗酸化剤を工業的に多量に、かつ安定に入手することは困難なのが現状である。また、通常、前述のSODはスーパーオキシドに対してのみ消去効果を有し、ヒドロキシラジカルに対しては全く効果がない。同様にマンニトールはスーパーオキシドを消去することができない。

【0008】消費者からの要望が強い、天然物由来で抗酸化効果を有する原料としては、例えば、ゴマ種子中の水溶性の抗酸化成分として、ゴマ脱脂粕等から得られる水溶性抽出物が抗酸化活性を有することが知られている（特公昭61-26342号公報等）。また、この脱脂粕抽出物にはリグナン配糖体類が含まれることがよく知られており、そのリグナン配糖体類が強力なヒドロキシラジカル消去活性を有することが知られている（特開平8-208685号公報等）。しかし、このゴマ種子等に含まれるリグナン配糖体はスーパーオキシドに対する消去活性は強いものとはいえない。

【0009】このような中、1種類の活性酸素種に対する消去活性だけでなく、スーパーオキシドとヒドロキシラジカルなど、複数種類の活性酸素種に対する強力な消去活性を有する、天然物由来の有効成分の安定供給が望まれているにも関わらず、これまで工業的に実用化された例は少ない。しかも、両活性を有する有効成分の供給

はほとんど無いといってよく、これらの安定的な供給が期待されている。

【0010】一方、古来から食経験豊かな植物の一つにモクセイ科、オリーブ属のオリーブ植物がある。オリーブは古くから栽培されてきた植物で、現在では地中海沿岸が代表的な栽培地域である。用途としては、特にオリーブ油として重宝されており、欧州はもちろん、日本や米国を初めとする世界各国で用いられている。オリーブ油は様々な効果を有することが知られており、古来から経験的に薬用あるいは化粧品用としても用いられてきた。また、オリーブの実はそのまま食用にも用いられ、場合によっては、保存食として塩蔵されたりしている。このことから、オリーブは、安定的に入手可能で、また人体にとって安全性の高い植物材料であるといえる。しかしながら、オリーブ油を搾油した際に残るオリーブ油粕は、肥料や燃料用として用いられているに過ぎなかった。

【0011】近年、オリーブ油に関しては、比較的酸化されにくい植物油であることが知られており、その中に含まれる微量成分のポリフェノール類が注目され、その生理的作用等について多くの研究がなされている（例えば、International Olive Oil Council, New Food Industry, Vol. 34, No. 4, 28-52, 1992）。しかしながら、オリーブに関してはオリーブ油以外についてはあまり知られていないのが現状である。特に、オリーブ植物中の抽出成分が強い活性酸素除去機能を有することは、これまで、全く知られていなかった。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、抗酸化効果、特に製品の保存安定性の向上効果等の優れた酸化防止効果と、各種疾病に対する予防効果や抗老化効果等の優れた生体内抗酸化効果を有し、かつ、安定で、人体に対する安全性が高く、用途の広い、新規の天然の抽出物を有効成分とする抗酸化剤を提供することを目的とし、特に酸化防止剤および生体内抗酸化剤を提供することを目的とする。

【0013】

【解決しようとする手段】本発明者らは、前記目的を達成するため鋭意検討した結果、オリーブ植物から得られる抽出物が、抗酸化効果、特に製品の保存安定性向上効果等の優れた酸化防止効果と、各種疾病予防効果や抗老化効果等の優れた生体内抗酸化効果を有することを見だし、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、オリーブ植物（葉を除く。以下同じ。）から得られる抽出物を有効成分として含有する抗酸化剤に関する。該抽出物はオリーブ植物および／またはオリーブ油製造工程で得られる生成物を水および／または有機溶媒で抽出処理して得ることができ、更に該抽出物を濃縮処理および／または分画・精製処理することで、該抽出物が有

する活性酸素除去機能が強化される。また、オリーブ油製造工程中で生じる生成物としては、圧搾残渣、抽出残渣、圧搾油、抽出油、脱ガム油滓、脱酸油滓、ダーク油、廃脱色剤、脱臭スカム、搾油ジュース、排水、廃濾過材から選ばれる1種または2種以上が挙げられ、本発明は、これらから得られる抽出物を含有する抗酸化剤に関する。本発明の抗酸化剤は、水に対して易溶性であるため、上記抽出処理は水または含水有機溶媒で抽出することが好ましい。また、濃縮や分画・精製処理は水溶解成分を濃縮等していくことで該抽出物が有する活性酸素除去機能を強化することができ、本発明の抗酸化剤の抗酸化効果、特に製品の保存安定性の向上効果等の優れた酸化防止効果や、各種疾病予防効果や抗老化効果等の優れた生体内抗酸化効果を向上させることができる。また、本発明は、同様にオリーブ植物（葉を除く）から得られる抽出物を含有する酸化防止剤に関し、また、生体内抗酸化剤に関する。酸化防止剤は特に保存安定性向上効果を得ることが期待され、生体内抗酸化剤としては特に各種疾病予防効果や抗老化効果を得ることが期待される。これらの抗酸化剤、酸化防止剤または生体内抗酸化剤は、水に易溶性であり、例えば一部または全部を水や含水有機溶媒に溶解した液状の状態にすることも好適にその効果を発揮させることができ、また、好適に使用することができる。該抗酸化剤、酸化防止剤または生体内抗酸化剤は、各種製品に配合することで製品の酸化防止効果を向上させること等ができるとともに、生体内抗酸化効果を有する飲食物等を製造することもできる。また、該抗酸化剤、酸化防止剤または生体内抗酸化剤を単独または飲食物等に含有する状態で内服させることで、生体内抗酸化効果を得ることができる。本発明の抗酸化剤、酸化防止剤または生体内抗酸化剤は、その効果を得るために内服等の直接的な使用をしても良く、また、各種製品の原料として配合しても良い。例えば、飲食物や皮膚外用剤等に好適に配合することができる。また、本発明は、オリーブから得られる抽出物を抗酸化剤として使用する方法に関し、特にオリーブから得られる抽出物を酸化防止剤として使用する方法に関し、オリーブから得られる抽出物を生体内抗酸化剤として使用する方法に関する。

【0014】

【実施の形態】以下に、本発明について詳細に説明する。本発明は、オリーブ植物、主に実または種子、さらに、果皮、種皮、茎、芽等から、また、これらの乾燥物、粉碎物、脱脂されたものから得られる抽出物を有効成分とする抗酸化剤に関する。本発明の抗酸化剤で用いる抽出物は、スーパーオキシド消去活性、ヒドロキシラジカル消去活性等の強い活性酸素除去機能等を有することから、該抽出物を有効成分とする抗酸化剤を使用することで、製品の保存安定性が向上する等の酸化防止効果が得られ、また、各種の疾病を予防する効果や抗老化効

果等の生体内抗酸化効果も得られる。本抽出物の含有量は特に制限されず、その抗酸化剤の求める効果の強さに応じて好適な量の抽出物を含有させることができる。本発明の抗酸化剤に用いる抽出物は、オリーブ植物から得られるが、特にオリーブ植物の実および／または種子から好適に得ることができ、また、脱脂されたオリーブ植物の実および／または種子から得られる抽出物は余計な油分等を除去する必要がないため好ましい。また、オリーブ植物にはオリーブ油の製造工程において生じる生成物、例えば圧搾残渣、抽出残渣、圧搾油、抽出油、脱ガム油滓、脱酸油滓、ダーク油、廃脱色剤、脱臭スカム、搾油ジュース、排水、廃濾過材を含むものとする。例えば、圧搾残渣や抽出残渣等の搾油粕はもちろん、油滓や通常は廃棄しているオリーブ油の搾油工程中で生じる排水からも該抽出物を得ることができる。オリーブの有効活用の面からも好ましいといえる。ここで、上記オリーブ植物等から水および／または有機溶媒で抽出することで得られる抽出物を含有する抗酸化剤に関し、好ましくは前記有機溶媒が親水性有機溶媒であり、さらには前記親水性有機溶媒がアルコールである場合が好ましい。本発明によれば強い活性酸素除去機能を有する抽出物を含有することで、優れた抗酸化効果を有する抗酸化剤を得ることができ、さらに、その抽出物の単位原料あたりの収率も高い。例えばゴマを用いた場合に比べて1～10倍の収率で得ることができる。この双方のことから、本抽出物は、活性酸素除去機能の強さに単位原料あたりの収率を乗じた活性酸素除去機能収量指数について、他の天然原料を用いた場合に比べて、大幅に高い値が得られる。スーパーオキシド消去活性に関しても、単位原料から得られる抽出物のスーパーオキシド消去活性収量指数が100以上、およそ100～3250程度であり、例えば、ゴマと比較した場合、1～650倍という高い値である。従って、強い活性酸素除去機能を有する抽出物を収率良く得ることができ、すなわち、本発明の優れた抗酸化効果を有する抗酸化剤を低い生産コストで得ることができる。さらに、本抽出物は濃縮処理および／または分画・精製処理されたものが好ましい。この濃縮、分画・精製処理等により、本抽出物の活性酸素除去機能が向上することで、本発明の抗酸化剤で2次的に得られる抗酸化効果、特に酸化防止効果や生体内抗酸化効果を強化することができる。濃縮処理としては、水および／または有機溶媒に対する溶解性を利用した可溶分回収処理および／または不溶分回収処理、水-疎水性有機溶媒での液々分配処理、再結晶処理、再沈殿処理、冷却により生じた析出物を回収する処理等を行うことができ、分画・精製処理としては、再結晶、再沈殿、順相および／または逆相クロマトグラフィーによる精製、脱色処理、脱臭処理等を行うことができる。例えば、水への溶解性を利用する方法によって濃縮等することにより本抽出物の活性酸素除去機能を向上させることができ、ま

た、脱色・脱臭等の処理をして無色、無臭にすることにより用途、使用性を向上させることもできる。また、該抽出物を含有する本発明の抗酸化剤においても、抗酸化効果が強くなり、用途、使用性が向上するため好ましい。これらの抗酸化剤、酸化防止剤または生体内抗酸化剤は、上述の様に本抽出物は水に易溶性であるため、例えば一部または全部を水や含水有機溶媒に溶解した液状の状態にすることができ、かつ、好適にその効果を発揮させることができる。液状の状態においても好適に効果を発揮し、かつ、使用し易いというメリットが生じる。該抗酸化剤、酸化防止剤または生体内抗酸化剤は、各種製品に配合することで製品の保存安定性を向上させること等ができるとともに、生体内抗酸化効果を有する飲食物等を製造することもできる。また、該抗酸化剤、酸化防止剤または生体内抗酸化剤を単独または飲食物等に含有する状態で内服させることで、生体内抗酸化効果を得ることができる。また、本発明は、オリーブから得られる抽出物を抗酸化剤として使用することができ、特にオリーブから得られる抽出物を酸化防止剤として使用すること、オリーブから得られる抽出物を生体内抗酸化剤として使用することができる。本発明の抗酸化剤、酸化防止剤または生体内抗酸化剤は、その効果を得るために内服等の直接的な使用をしても良く、各種製品の原料として配合しても良い。例えば、飲食物、皮膚外用剤、医薬品、飼料等の保存安定性を向上させる抗酸化剤としても使用でき、また、飲食物に配合した場合には、保存安定性に優れた、天然成分を含有する生活習慣病等に有効な飲食物を製造することができる。配合量は特に制限されず、その飲食物に応じて好適な量の抽出物を配合することができる。ここで、本発明の抗酸化剤等は、オリーブという植物由来のものであるので、人体への安全性に優れ、かつ、一般的な植物であるので安定的な供給が可能であるので好ましい。

【0015】本発明の原料として用いるオリーブ植物 (*Olea europaea* L.) は、国産、欧州産などの産地、食用あるいは搾油用を問わず使用できる。本発明の抗酸化剤で用いる抽出物は、天然植物であるオリーブ植物の、主に実または種子から得ることができる。さらに、その果皮、茎、芽から得ることができる。また、これらの乾燥物、粉碎物、脱脂物からも好適に得ることができる。また、上記オリーブ植物の果実やその脱脂物等に、添水する等により加水した場合、蒸気により蒸す等の加湿処理を行った場合、これらオリーブ植物の果実やその脱脂物等が適度に膨潤するので、抽出効率が良くなり好ましい。

【0016】特に、オリーブ植物の脱脂物からは、抽出物が非常に高い収率で得られ、かつ、得られた抽出物から油分を除去する必要がないため好ましい。また、オリーブ植物または当該脱脂物に含まれる脂質成分をペンタン、ヘキサン、ヘプタン等の炭化水素、酢酸エチルエ

テル等の低級脂肪酸アルキルエステル、ジエチルエーテル等の公知の非水溶性の有機溶媒の1種又は2種以上で抽出除去し、更に必要に応じてこの洗浄処理を繰り返した脱脂物も利用できる。

【0017】オリーブ植物から水および/または有機溶媒で抽出することにより、本発明の抗酸化剤で用いる抽出物を得ることができる。

【0018】オリーブ植物から本発明の抗酸化剤で用いる抽出物を得るために用いる有機溶媒としては、親水性有機溶媒、疎水性有機溶媒のいずれでもよい。具体的には、親水性有機溶媒として、メチルアルコール、エチルアルコール、グリセリン、プロピレングリコール、1, 3-ブチレングリコール等のアルコール、アセトン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、1, 4-ジオキサン、ピリジン、ジメチルスルホキシド、N, N-ジメチルホルムアミド、酢酸等の公知の有機溶媒が挙げられ、疎水性有機溶媒として、ヘキサン、シクロヘキサン、四塩化炭素、クロロホルム、ジクロロメタン、1, 2-ジクロロエタン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、ベンゼン、トルエン等の公知の有機溶媒が挙げられる。また、これらの有機溶媒は1種または2種以上を組み合わせ使用することができる。

【0019】工業的には、例えば植物組織への浸透性、抽出効率等からは、水および/または親水性有機溶媒を用いることが好ましく、また含水親水性有機溶媒を用いることが好ましい。具体的にはメチルアルコール、エチルアルコール、グリセリン、プロピレングリコール、1, 3-ブチレングリコール等のアルコール、アセトン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル等の有機溶媒およびこれらの含水溶媒が挙げられる。これらの中から選ばれる、1種または2種以上により、オリーブ植物から、本発明の抗酸化剤で用いる抽出物を得ることができる。

【0020】抽出成分の溶解性についての特性を利用すると、活性酸素除去機能を有する抽出物を得るには、水および/または親水性有機溶媒、好ましくは含水親水性有機溶媒、さらに好ましくは含水率の高い含水親水性有機溶媒を用いた抽出が好ましい。

【0021】抽出条件は、特に限定されないが、例えば、温度は5℃~95℃、好ましくは10℃~90℃、さらに好ましくは15℃~85℃で、常温でも好適に抽出することができる。温度が高いほうが、抽出効率が高くなる傾向はある。圧力は、常圧でも、加圧でも、吸引等による減圧でも好適にすることができる。また、抽出効率を向上させるため、振とう抽出や、攪拌機等のついた抽出機でも抽出することができる。抽出時間は、他の抽出条件によるが、数分~数時間であり、長時間なほど十分な抽出がなされるが、生産設備、収率等の生産条件によって適宜決めれば良い。また、抽出に使用する溶媒は、原料に対し1~100倍量(「質量/質量」。以下

同様。)、好ましくは1〜20倍量を使用することができる。

【0022】得られる抽出物の収率およびその後の回収方法を考慮すると、水および/または親水性有機溶媒を用いることが好ましく、また含水親水性有機溶媒を用いることが好ましい。また含水親水性有機溶媒での抽出処理する場合には、親水性有機溶媒含量が10質量%〜95質量%である含水親水性有機溶媒で抽出することが好ましく、さらには親水性有機溶媒含量が20質量%〜95質量%の含水親水性有機溶媒を使用することが好ましく、最も好ましくは親水性有機溶媒含量が30質量%〜95質量%に調製された含水親水性有機溶媒であることが好ましい。

【0023】また、得られる抽出物が有する活性酸素除去機能の強さをも考慮に入れた場合、含水親水性有機溶媒での抽出において、親水性有機溶媒含量が10質量%以上である含水親水性有機溶媒で抽出することが好ましく、さらには親水性有機溶媒含量が40質量%以上の含水親水性有機溶媒を使用することが好ましく、最も好ましくは親水性有機溶媒含量が40質量%〜80質量%に調製された含水親水性有機溶媒であることが好ましい。

【0024】また、飲食物等への使用、皮膚への塗布を含む人体への使用における安全性等を考えれば、特に、水および/またはアルコールのいずれかにより抽出することが好ましい。

【0025】得られる抽出物の収率およびその後の回収の面からは、水および/またはアルコールを用いることが好ましく、また含水アルコールを用いることが好ましい。また含水アルコールでの抽出処理する場合には、アルコール含量が10質量%〜95質量%である含水アルコールで抽出することが好ましく、さらにはアルコール含量が20質量%〜95質量%の含水アルコールを使用することが好ましく、最も好ましくはアルコール含量が30質量%〜95質量%に調製された含水アルコールであることが好ましい。

【0026】また、得られる抽出物が有する活性酸素除去機能の強さをも考慮に入れた場合、アルコール含量が10質量%以上である含水アルコールで抽出することが好ましい。さらにはアルコール含量が40質量%以上の含水アルコールを使用することが好ましく、最も好ましくはアルコール含量が40質量%〜80質量%に調節された含水アルコールが好ましい。

【0027】ここで、本発明で使用するアルコールは、メチルアルコール、エチルアルコール、1-プロパノール、1-ブタノール等の1級アルコール、2-プロパノール、2-ブタノール等の2級アルコール、2-メチル-2-プロパノール等の3級アルコールさらにエチレングリコール、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール等の液状多価アルコール等の公知の溶媒が挙げられ、これらの溶媒は1種または2種以上を組み合わせ

せて使用することができる。

【0028】工業的には、生産コストの面、および、蒸留による溶媒除去等のハンドリングの面から見ても、特に低級アルコールを使用することが好ましい。ここで、低級アルコールとは、炭素数が1〜4である公知のアルコール、例えば、前述の1、2、3級、もしくは、液状多価のアルコール等があげられ、これらの1種または2種以上を組み合わせ使用することができる。

【0029】その他、オリーブ油の製造工程において生じる生成物、例えば圧搾残渣、抽出残渣、圧搾油、抽出油、脱ガム油滓、脱酸油滓、ダーク油、廃脱色剤、脱臭スカム、搾油ジュース、排水、廃濾過材もオリーブ植物に含まれ、これらからも活性酸素除去機能を有する本抽出物が得られる。オリーブの有効活用の面からも好ましい該抽出物の製造方法である。ここで、オリーブ油の搾油工程で生じる排水からも活性酸素除去機能を有する抽出物を得ることができる。特に、オリーブ油を搾油するに際し、オリーブ実を圧搾すると油分と水分を含んだジュースと呼ばれるものが得られ、これから水分を除去し、オリーブ油を得るが、この水相部分を回収することで好適に本抽出物が得られる。

【0030】このように、水および/または有機溶媒を用いた抽出により、活性酸素除去機能を有する抽出液を製造できる。また、本抽出物の水可溶性等の成分は、活性酸素除去機能が強く、これを含有する抗酸化剤もより強力な抗酸化効果を有する。

【0031】このようにして得られた抽出液から、溶媒、水分を除去することで、乾固状の本発明の抗酸化剤に用いる抽出物を得ることができる。溶媒、水分の除去は減圧蒸留、減圧・真空乾燥、凍結乾燥、スプレードライ等の公知の方法で行うことができる。もちろん、溶媒、水分を含んだままでも良く、また、溶媒のみ除去して水溶液状のものを得ることもできる。さらに、溶媒、水分除去の程度を調整することで該抽出物の濃度が調整された、つまり、活性酸素除去機能の強さが調整された水溶液を調製することもできる。また、難水溶性成分を含有したままでも、それらを除去した水溶液としても良い。

【0032】また、本発明の製造方法によれば、原料単位あたり、活性酸素除去機能を有する抽出物を他の天然原料に比べても高い収率で、例えばゴマを用いた場合に比べて1〜10倍の収率で得ることができる。

【0033】また、脱脂物からの抽出物は、トリグリセライド、ステロール、トコフェロール等の油溶性成分は含有していないので、これらを除去、精製する必要がないため、好ましい。

【0034】また、オリーブ油の製造工程において生じる生成物、例えば圧搾残渣、抽出残渣、圧搾油、抽出油、脱ガム油滓、脱酸油滓、ダーク油、廃脱色剤、脱臭スカム、搾油ジュース、排水、廃濾過材からも活性酸素

除去機能を有する抽出物が得られるので、オリーブの極めて優れた有効利用方法であり、生産コストの面から見ても優れた方法といえる。

【0035】これらの抽出物はそのまま用いても良いが、必要によりさらに濃縮処理および／または分画・精製処理したものをを用いることができる。

【0036】濃縮処理については、特に限定されないが、例えば濃縮処理が、水および／または有機溶媒に対する溶解性を利用した可溶分回収処理および／または不溶分回収処理、水-疎水性有機溶媒での液々分配処理、再結晶処理、再沈殿処理、冷却により生じた析出物を回収する処理から選ばれる1種または2種以上の処理により、好適に濃縮処理することができる。

【0037】例えば、水への溶解性を利用した濃縮方法を用いることによって、水に容易に溶ける成分、つまり水可溶性等の成分と、水に溶解しにくいおよび／または水に溶解しない成分、つまり難水溶性等の成分に分離することができる。ここで、水可溶性等の成分の濃縮物は、難水溶性等の成分に比べ、活性酸素除去機能が高いことが見出された。

【0038】また、濃縮方法の一つとして、オリーブ植物より得られた抽出液から、溶媒除去する過程において、濃縮物を容易に得ることができる。すなわち、溶媒のみを除去した水溶液において、水可溶分と水不溶分をろ過処理、遠心処理、デカンテーション処理等により分離し、水可溶分を脱水・乾燥させることで、強い活性酸素除去機能を有する水可溶性等の濃縮物を得ることができる。このように、非常に簡単な方法で濃縮物を得られることから、効率面でも非常に優れた濃縮方法であるといえる。

【0039】また、オリーブ植物から抽出し乾固した抽出物に水を添加・攪拌することで、水に溶解しにくい成分および／または水に溶解しない成分、つまり難水溶性等の成分と水に容易に溶ける成分に分けることで、大幅に濃縮することができる。オリーブ植物からの抽出物に含まれる水可溶性等の濃縮物は、該抽出物全体や、抽出物中の難水溶性等の成分と比べても、活性酸素除去機能が大幅に優れていることが確認された。

【0040】このように、濃縮物はオリーブ植物からの抽出物を水に添加・攪拌した後、可溶分と不要分を分別することで簡易に得ることができる。また、水の量や温度を調整することで、得られる上記の水可溶性等の成分の成分の量と活性酸素除去機能の強さを調整することができる。

【0041】また、本抽出物は、必要に応じて、一般的な溶剤の組合せによる液-液分配により濃縮することができる。溶剤の組合せは一概に規定し難いが、例えば、水-疎水性有機溶媒の組合せが挙げられ、疎水性有機溶媒としては、ヘキサン、四塩化炭素、クロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、ジエチルエー

テル、酢酸エチル、n-ブタノール、ベンゼン、トルエン等の公知の有機溶媒が挙げられる。この液-液分配において、水相の水を除去することによって、活性酸素除去機能を有する本抽出物を得ることができる。

【0042】さらに、本抽出物、該抽出物を濃縮処理したものは、分画・精製処理することができる。これにより上記濃縮以上に濃縮することができる。分画・精製処理することの利点としては、活性酸素除去機能を非常に向上させることができることに加え、不純物を除去することができること等が挙げられる。すなわち、該分画・精製処理した場合、本発明の抗酸化剤に余計な色をつけることなく好適に配合することができる等のメリットがあり、好ましい。

【0043】分画・精製処理の方法については特に制限されないが、例えば、順相および／または逆相クロマトグラフィーによる精製、再結晶、再沈殿、脱色処理、脱臭処理から選ばれる1種または2種以上の処理により好適に分画・精製処理することができる。特にクロマトグラフィーの中でも液体クロマトグラフィーを利用する方法は、本発明の抗酸化剤に用いる抽出物、濃縮物を分解することなく、収率良く分画・精製出来るので、好ましい。液体クロマトグラフィーとしては、具体的に、順相液体クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等が挙げられるが、本抽出物や濃縮物を分画・精製処理する際には、いずれの方法でも用いることができる。とりわけ、分離能、処理量、工程数等を考慮に入れると、順相液体クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が好ましい。

【0044】ここで、順相液体クロマトグラフィーとは、例えば以下のような方法を指す。すなわち、例えばシリカゲルを固定相、ヘキサン-酢酸エチル混液、クロロホルム-メタノール混液等を移動相としたカラムを作成し、オリーブ植物からの抽出物あるいはその濃縮物を負荷率0.1~5% (wt (質量)/v (体積)) で供し、単一移動相による連続的溶出法あるいは溶媒極性を順次増加させる段階的溶出法により、所定の画分を溶出させる方法である。逆相液体クロマトグラフィーとは、例えば以下のような方法を指す。すなわち、例えばオクタデシルシランを結合させたシリカ(ODS)を固定相、水-メタノール混液、水-アセトニトリル混液、水-アセトン混液等を移動相としたカラムを作成し、オリーブ植物からの抽出物あるいはその濃縮物を負荷率0.1~5% (wt (質量)/v (体積)) で供し、単一溶媒による連続的溶出法あるいは溶媒極性を順次低下させる段階的溶出法により、所定の画分を溶出させる方法である。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)とは、原理的には、上記順相液体クロマトグラフィーあるいは

逆相液体クロマトグラフィーと同様のものであり、より迅速かつ高分離能での分画・精製を行うためのものである。上記手法を1種または2種以上組合わせることで、非常に濃縮でき、かつ、不純物が除去された状態で得ることができるため好ましい。さらに、上記手法を1種または2種以上組合わせることで、本抽出物が有する活性酸素除去機能を得るための濃度を調整することができ、必要に応じた機能の強さ、特性等を設計することもできる。

【0045】濃縮処理は繰返し濃縮処理しても良く、異なる濃縮処理を組合わせても良い。同様に、分画・精製処理も繰返し分画・精製処理しても良く、異なる分画・精製処理を組合わせても良い。更に、濃縮処理を行った後に分画・精製処理しても良く、分画・精製処理を行った後に分画・精製処理しても良く、濃縮処理した後に分画・精製処理を行い更に濃縮処理することもできる。当然、前述の組み合わせ以外の組み合わせでも良い。

【0046】また、オリーブ植物から得られる抽出物から、濃縮処理したもの、さらに分画・精製処理したものを、脱色および／または脱臭処理した場合、不要な成分が除去され、かつ、無色～淡色および／または無臭～無臭に近い状態になるので、色や、香りによる、使用の制限を受けないため、幅広い用途が確保できるため好ましい。脱色方法としては、活性炭処理や白土処理等があげられ、脱臭方法としては、同様に活性炭処理、白土処理があげられ、さらに超臨界抽出、水蒸気蒸留等が挙げられる。

【0047】また、オリーブ油の製造工程において生じる生成物、例えば圧搾残渣、抽出残渣、圧搾油、抽出油、脱ガム油滓、脱酸油滓、ダーク油、廃脱色剤、脱臭スカム、搾油ジュース、排水、廃濾過材からも活性酸素除去機能を有する抽出物が得られるが、同様にして濃縮、分画精製を行うことができる。

【0048】濃縮および／または分画・精製の組合せは特に制限されないが、本発明の抗酸化剤に用いる抽出物は、水に対して易溶性であるため、上記抽出処理は水または含水有機溶媒で抽出することが好ましく、また、濃縮や分画・精製処理は水可溶成分を濃縮等していくことで本抽出物が有する活性酸素除去機能を向上させることができる。抽出処理と濃縮処理および／または精製処理の組み合わせは特に制限はされないが、例えば、オリーブ植物を水および／または親水性有機溶媒で抽出処理した後、得られた抽出液について、親水性有機溶媒の一部または全部を除去し、水可溶分を回収することで濃縮する。ろ過や遠心分離等によって回収することができるが、この回収効率の向上のため、必要に応じ水溶液に対して水を添加・攪拌等の処理を行うことができる。また、オリーブ植物から得られる抽出液の水および／または親水性有機溶媒を除去した乾固状態の抽出物について、上記同様に水を添加・攪拌等の処理を行い、ろ過等

によりその水可溶分を回収することで濃縮処理することができる。これらの濃縮物を順相および／または逆相クロマトグラフィーおよび／または再結晶にて分画・精製処理することができる。

【0049】得られた抽出物、該抽出物を濃縮処理および／または精製処理したものは単独でも、これらを2種類以上組み合わせても使用することもできる。これにより、活性酸素除去機能の強さの特性等を設計することができ、さらに好適な活性酸素除去機能を有する抽出物として使用することができる。さらに、他の抗酸化剤を配合して使用することができ、これにより、効果の強さ等の詳細な設計が可能であり、また、他の機能物質との相乗効果により大幅な機能強化も期待できる。

【0050】本発明の抗酸化剤に用いる抽出物の活性酸素除去機能を有する成分は、特に水系の製品に好適に配合することができる。本抽出物は水に容易に溶解する成分が抗酸化効果を有するため、水系の製品に好適に使用することができる。一般的な抗酸化剤は例えば植物油由来のトコフェロール類等、油性（非水性）のものが多く、実際の使用に際しては制約を受けることも多い中で、本抽出物の活性酸素除去機能を有する成分は水溶性である（水溶性成分を含んでいる）ので応用範囲が非常に広く、本抽出物を使用した抗酸化剤は、汎用性の高い抗酸化剤と言える。本発明の抗酸化剤は、水系、あるいは、乳化系等、幅広い範囲の飲食物において好適に使用することができ、これを均一に溶解、ないしは分散させて含有させることができる。

【0051】また、本発明の抗酸化剤の油系への使用は、特に単なる抽出物段階では、油に溶解しにくい成分、油に溶解しない成分が比較的多く含まれていること等の理由から、油脂等への好適な利用は、不溶分を除去する等の精製を行った抽出物を配合するか、また、水および乳化剤を配合することで乳化物として利用することが好ましい。

【0052】上述の通り、本発明の抗酸化剤に用いる抽出物は活性酸素除去機能を有する。活性酸素除去機能とは、生体内または食品や医薬品、農薬等において、活性酸素種の生成を抑制、捕捉、消去、不均化、分解等する機能を示す。より具体的には、例えば、活性酸素種生成の原因となる金属イオンのキレート化および不活性化による活性酸素生成抑制、生成した活性酸素種の消去あるいは分解、酵素等による不均化、ラジカルの捕捉または安定化によるラジカル連鎖反応の抑制および遮断等が挙げられる。ここで、活性酸素種とは、主にスーパーオキシド、ヒドロキシラジカル、パーヒドロキシラジカル、過酸化水素、一重項酸素等を示し、さらには、脂質、蛋白質、炭水化物、核酸等の過酸化物およびこれらから派生するフリーラジカルをも含むものとする。これらの活性酸素種は、食品や生体内における脂質、蛋白質、炭水化物、核酸等の様々な成分を強力に酸化し、本来の成分

とは異なる成分に変換または分解してしまう。したがってこの機能は、生体内または皮膚外用剤等に含まれる成分の酸化的劣化の防御剤として有用である。本抽出物は、これらの中でも、特に、高いスーパーオキシド消去活性およびヒドロキシラジカル消去活性を有する。

【0053】スーパーオキシド消去活性とは、酸素分子の1電子還元により生成するスーパーオキシドを不均化、無効にする活性である。スーパーオキシドは、例えば生体内においては、白血球やミトコンドリア等で生成され、酸素を利用した生命活動においてその生成を免れることは出来ないものである。また、スーパーオキシドは、その反応性は比較的低く、鉄や一酸化窒素などの限られたものとししか反応しないが、過酸化水素の生成源になるなど他の活性酸素種の生成につながり、生体成分に酸化傷害を引き起こす作用を有するため、生成後すぐに消去されるべき重要な活性酸素種である。スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)はスーパーオキシド消去効果を有し、原核生物ですら保有している生体内酵素であるが、より積極的に生体成分を保護するためにはスーパーオキシド消去活性を有する物質を生体に適用することが望ましい。しかし、例えばこのSODは酵素蛋白であり安定性が乏しく、経口投与した場合には、殆どが排泄されてしまうため実効力は極めて低い。すなわち、本抽出物は、摂取することで安定的にそのスーパーオキシド消去活性を享受できるものである。より効果的に生体成分を保護することで、健康な体を保つことあるいは肌を美しいものにすること等に大きく寄与するものである。

【0054】本抽出物は抽出物レベルでありながら、強いスーパーオキシド活性機能を有する合成の抗酸化剤であるBHAを上回る強力なスーパーオキシド消去活性をしており、スーパーオキシド消去剤、脂質過酸化防止剤としての利用の他、生体内における酸化防止剤(生体内抗酸化剤)としても利用することができる。

【0055】ヒドロキシラジカル消去活性とは、種々の要因により生成したヒドロキシラジカルを捕捉、安定化させる活性である。ヒドロキシラジカルは、例えば酸素を利用した生命活動においては、その生成を免れることは出来ず、種々の活性酸素種の中でも非常に反応性に富む化学種であり、あらゆる生体成分を酸化損傷させ得る最も毒性の高い活性酸素種である。このヒドロキシラジカルの生成経路の一つとしては、生体内に存在する鉄イオンが過酸化水素やスーパーオキシドに関与するフェントン反応等が挙げられるが、生体内にはヒドロキシラジカルに対する有効な除去機構が存在しないため、ヒドロキシラジカル消去活性を有する物質の摂取は必要不可欠である。このヒドロキシラジカルの除去剤としては、マンニトールやトリプトファン、ギ酸等がある。しかしながら、これらのものの中には、単一品でありながらかなりの高濃度添加を要するものが多い。すなわち、該抽出

物を含有する抗酸化剤は、摂取することでそのヒドロキシラジカル消去活性を享受できるものであり、効果的に生体成分を保護することで健康な体を保つことあるいは肌を美しいものにすること等に大きく寄与するものである。

【0056】本抽出物は、抽出物レベルとしては、かなり少量でヒドロキシラジカルを消去(例えば、リノール酸の過酸化を抑制)することが可能であり、通常のヒドロキシラジカルの除去剤と比べても非常に有効であるといえる。ヒドロキシラジカル消去剤、脂質過酸化防止剤として使用でき、生体内における酸化防止剤(生体内抗酸化剤)、脂質等の酸化を受け易い成分を含有する飲食物、化粧品、医薬品、飼料等のあらゆる製品の保存安定性を向上させる抗酸化剤としても使用できる。

【0057】しかも、前述のSODはスーパーオキシドに対してのみ消去効果を示し、ヒドロキシラジカルに対しては全く消去活性が無く、また、同様にマンニトールはスーパーオキシドを消去出来ない。これに対して、本抽出物はこの両者に対して、消去効果を示す。すなわち、本抽出物は、強いスーパーオキシド消去活性、および、強いヒドロキシラジカル消去活性という両方の活性酸素除去機能を有するので、極めて汎用性が高いといえる。また、効果の面からは、スーパーオキシド消去活性、ヒドロキシラジカル消去活性の両方の活性酸素除去機能を有することから、生体内抗酸化効果を有するものとして優れており、併せて、ヒドロキシラジカル消去活性による脂質過酸化防止効果から皮膚外用剤の他、飲食物、化粧品、医薬品、飼料等の保存安定性向上効果を有するものとして優れている。

【0058】他の天然抗酸化物質と活性酸素除去機能を比較すると、例えば比較的活性酸素除去機能が強いとされるゴマ粕由来の抽出物のスーパーオキシド消去活性は5~10 unit/(mg/mL)であるのに対し、本抽出物はスーパーオキシド消去活性が20~65 unit/(mg/mL)であり、ゴマ粕由来抽出物の2~13倍という、非常に高い効果を有する。

【0059】ここで、本方法は、活性酸素除去機能の強い抽出物を得ることができ、さらに、その単位原料あたりの収率も高い。この双方のことから、活性酸素除去機能の強さに、単位原料あたりの収率を乗じた活性酸素除去機能収量指数<式1>について、他の天然原料を用いた場合に比べて、大幅に高い値が得られる。つまり、単位原料あたりに得られる活性酸素除去機能の総量が大きいということである。よって、本抽出物を生産し、使用することで、活性酸素除去機能が強い製品はもちろん、他の天然の抗酸化剤等と置き換えた場合、単位原料から得られる活性酸素除去機能の総量が大きいことにより多くの製品をつくることができる、ということであり、このことは、コスト面からのメリットも期待できるということである。また、この活性酸素除去機能収量指数を参考

とすることで、好適な生産条件を決めることもできる。

【0060】

【数1】＜式1＞ 活性酸素除去機能収量指数＝活性酸素除去機能の強度×単位原料あたりの収率（％）

【0061】スーパーオキシド消去活性に関していえば、単位原料から得られる抽出物のスーパーオキシド消去活性収量指数＜式2＞がおおよそ100～3250である。例えば、ゴマと比較した場合、スーパーオキシド消去活性収量指数が5～100であるので、ゴマの場合の1～650倍という高い値である。つまり、同じ単位原料あたりで1～650倍の活性酸素除去機能が得られるということである。

【0062】

【数2】＜式2＞ スーパーオキシド消去活性収量指数＝スーパーオキシド消去活性（unit／（mg／mL））×単位原料あたりの収率（％）

【0063】本発明の抗酸化剤に用いる抽出物は、スーパーオキシド消去活性、ヒドロキシラジカル消去活性等の活性酸素除去機能を有するが、該抗酸化剤を人体やその他飲食物、医薬品、肥料、飼料や皮膚外用剤に使用することで、様々な2次的な効果を得ることができる。今までにも述べているが、例えば、抗酸化効果、特に製品の保存安定性の向上効果等の優れた酸化防止効果や、各種疾病予防効果や抗老化効果等の優れた生体内抗酸化効果が得ることができる。

【0064】抗酸化効果とは、食品や生体内における脂質、蛋白質、炭水化物、核酸等の様々な成分が酸化され、本来の成分とは異なる成分に変換または分解してしまうことを抑制あるいは防止する効果である。したがってこの効果は、生体内または食品や医薬品、農業等に含まれる成分の酸化的劣化の防御の点で有用であり、食品産業、特に水産加工品、健康食品、栄養食品のほか、医薬品・農業分野や化粧品分野において実利的な利用が期待されるものである。具体的には飲食物、医薬品、肥料、飼料や皮膚外用剤等の製品の保存性向上効果等の酸化防止効果、各種疾病防止効果や抗老化効果等の生体内抗酸化効果等を得ることができる。

【0065】酸化防止効果とは、飲食物、皮膚外用剤、医薬品、飼料等に含有される酸化され易い成分、特に不飽和脂肪酸を含む脂質等の酸化劣化を防止する効果を示す。飲食物、皮膚外用剤、医薬品、飼料等に含有される成分の酸化劣化は、その品質劣化、栄養性・機能性低下等の保存安定性上の問題の大きな原因となる。したがって、各種成分の酸化を抑えることができれば、飲食物、皮膚外用剤、医薬品、飼料等の品質を安定化および保持することが可能である。この点において、本抽出物は、活性酸素除去機能を有するため、各種成分の酸化を最小限に抑えることが期待でき、非常に好ましい。すなわち、該抽出物を含有する抗酸化剤は、飲食物、皮膚外用剤、医薬品、飼料等に含有される成分の酸化を防止する

ことで、その保存安定性向上、品質向上、栄養性・機能性保持等に大きく寄与するものである。

【0066】本発明の抗酸化剤は、実際に該抗酸化剤を含有する飲食物や化粧品を作成した場合、該抗酸化剤を含有していない同等品と比べて、明らかな酸化防止効果を有している。このため本発明の抗酸化剤は酸化防止剤として使用することができる。すなわち、例えば、クッキーを作製し、60℃、暗所で18日間保存した後、常法に則って保存後のクッキーから油分を抽出し、そのPOVを測定比較すると、本発明の抗酸化剤は、明らかにクッキーの主に油脂の酸化を防止しており、高い酸化防止効果を有することが分かる。また同時に、本発明の抗酸化剤の酸化防止効果は、実際に該抗酸化剤を含有する飲食物や化粧品を作成した場合、該抗酸化剤を含有していない同等品と比べて、明らかに保存安定性が向上していることから明らかである。すなわち、例えば、クッキーを作製し、60℃、暗所で18日間保存した後に試食した結果では、該抗酸化剤を含有していないクッキーはかなりの酸化劣化臭を有していたのに対し、本発明の抗酸化剤を配合したクッキーは明らかに良好な風味を保持することから、該抗酸化剤の酸化防止効果により保存安定性が向上していることが分かる。本発明の抗酸化剤を酸化防止剤として各種製品に使用することで、該製品について保存安定性向上効果等を得ることができる。

【0067】また、生体内抗酸化効果とは、生体内においてその生成を免れることができない活性酸素種を除去することで、生命活動において重要な生体成分を保護する効果を示す。一般に、生体内で発生した活性酸素種は、脂質、蛋白質、糖質、核酸等の生命活動において重要な生体成分、特に不飽和脂肪酸を含有する脂質類を強力に酸化し、本来の成分とは異なる成分に変換または分解してしまう。さらに、このような現象が体内に蓄積することが様々な疾病や老化現象の原因となることが知られているが、これに対して生体内抗酸化効果を有するものの適用が、これら疾病や老化の予防や改善につながることも明らかになってきている。したがって、本発明の抗酸化剤は、本抽出物が有する活性酸素除去機能により得られる生体内抗酸化効果により、生体成分を保護するものであり、ひいては、活性酸素種等が引き起こす様々な疾病や老化現象を予防および改善できるような、各種疾病予防効果および／または抗老化効果を有するものである。

【0068】本発明の抗酸化剤の生体内抗酸化効果は、例えば、動物試験によって検討することができる。その試験とはすなわち、ラットを用いて、該抗酸化剤を含有する飼料を与えた場合と、通常の餌組成である飼料を与えた場合とで、生体内抗酸化力に如何なる差が生じるかを検討するものである。この結果は人間に対しても同様の傾向を示す。生体内抗酸化力とは、具体的には例えば、ラットの肝臓そのものの抗酸化力を測定すればよ

い。この試験において、該抗酸化剤を含有する飼料を与えた場合は、通常の餌組成である飼料を与えた場合に比べて、有意に生体内抗酸化力が向上している。すなわち、本発明の抗酸化剤は、明らかに生体内抗酸化効果を有することが分かる。また同様に、該抗酸化剤の投与量を増減した場合には、投与量依存的に生体内抗酸化力が変動する。すなわちこれは、該抗酸化剤の投与量と生体内抗酸化効果がほぼ比例関係にあることを示しており、該抗酸化剤の生体内抗酸化効果はその投与量に依存的であるといえる。このことは、本発明の抗酸化剤を各種用途に展開した場合に、その使用量に応じた生体内抗酸化効果を得られるということなので、その使用の目的、手段等に応じて適宜使用量を定められるというメリットがあり、大変好ましい。

【0069】また、本発明の抗酸化剤の生体内抗酸化効果は、人に摂取させた試験によって評価することができる。例えば、本抽出物をそのまま、または、該抽出物が配合された錠剤、散剤、カプセル等、その他様々な剤形に調製された本発明の抗酸化剤を人が経口摂取した場合と、本抽出物が無配合のものを経口摂取した場合との比較において、いかなる差が生じるかを評価するものである。この場合の生体内抗酸化力とは、具体的には例えば、試験期間中、一定期間毎（例えば10日毎）に被験者の血液を採取し、遠心分離等により血清を調製し、その血清中の過酸化脂質（PCOOH）量を測定すればよい。この試験において、本発明の抗酸化剤を人が経口摂取した場合は、試験開始から経日的に過酸化脂質量が減少し、30日後には過酸化脂質生成量を大幅に抑制する。一方、本抽出物が無配合のものを経口摂取した場合には、このような過酸化脂質生成を抑制する効果は全く見られないことから、本発明の抗酸化剤を摂取した場合には、有意に生体内抗酸化力が向上していることが分かる。すなわち、本発明の抗酸化剤は、人体に対しても明らかに生体内抗酸化効果を有することが分かる。更には、本発明の抗酸化剤、特に生体内抗酸化剤として使用される場合において、各種疾病防止効果および／または抗老化効果を発揮する。

【0070】本抽出物の原料であるオリーブは、安定的に入手することができる植物原料である。天然由来であり、食品・食用として広く用いられているオリーブを原料として得られる抽出物であることから、人体にとって安全性の高い抽出物であるといえる。

【0071】本発明によれば、活性酸素除去機能を有するオリーブ抽出物を含有する抗酸化剤を得ることができる。さらに、該抽出物を濃縮、分画・精製処理することで活性酸素除去機能を向上させた該抽出物を得ることができるため、濃縮条件等を調整することにより、求める強さの機能を有する該抽出物を得ることができ、該抽出物を含有することで求める強さの抗酸化効果を有する抗酸化剤を得ることができる。また、該抗酸化剤は、飲食

物、皮膚外用剤等の様々な用途に利用することができる。さらに、オリーブ植物から容易に得ることができ、また、オリーブ油の製造工程中に発生する通常は廃棄されている生成物からも好適に得ることができることから、コスト面からみても、資源の有効活用という面からみても好ましい。

【0072】本発明の抗酸化剤は一般的な方法により製剤化できる。有効成分として含有されるオリーブ植物から得られる抽出物は、粗抽出物でも濃縮および／または分画・精製されたものでも良いが、特に水溶性成分を濃縮および／または分画・精製した抽出物を用いることが好ましい。オリーブ植物から得られる抽出物に関し、水溶性成分の画分等が活性酸素除去機能が強いいため、該水溶性成分を濃縮等した抽出物を用いることが好ましい。

【0073】また、本発明の抗酸化剤の形態としては、散剤、カプセル剤（硬カプセル剤、軟カプセル剤など）、顆粒剤（コーティングした物、丸剤、トローチ剤、液剤、またはこれらの製剤学的に許容され得る徐放化製剤など）などが挙げられる。

【0074】これらの製剤は公知の製剤学的製法に準じ、製剤として薬理学的に許容され得る基剤、担体、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤等と共に用いてもよい。

【0075】これらの製剤に用いる担体や賦形剤としては、例えば乳糖、ブドウ糖、白糖、マンニトール、馬鈴薯デンプン、トウモロコシデンプン、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、結晶セルロース、カンゾウ末、ゲンチアナ末などが挙げられる。

【0076】これらの製剤に用いる結合剤としては、例えばデンプン、トラガントゴム、ゼラチン、シロップ、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロースなどが挙げられる。

【0077】これらの製剤に用いる崩壊剤としては例えばデンプン、寒天、ゼラチン末、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、結晶セルロース、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、アルギン酸ナトリウムなどが挙げられる。

【0078】これらの製剤に用いる滑沢剤としては例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、水素添加植物油、マクロゴールなどが挙げられる。

【0079】これらの製剤に用いる着色剤としては医薬品に添加することが許容されているものを、それぞれ用いることができる。

【0080】また、注射剤を調製する場合は、必要に応じて、pH調節剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤などを添加して、常法により各注射剤とする。

【0081】錠剤、顆粒剤を調製する場合は、必要に応じて、白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、精製セラック、ゼラチン、グリセリン、ソルビトール

ル、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、フタル酸セルロースアセテート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メチルメタクリレート、メタアクリル酸重合体などで被膜しても良いし、2つ以上の層で被膜しても良い。さらにエチルセルロースやゼラチンのような物質のカプセルでも良い。

【0082】外用剤の形態としては、経皮投与用または口腔内あるいは経鼻などの経粘膜投与用の固体、半固体、半固体状、または液状の製剤が挙げられる。液状製剤としては、例えば製剤学的に許容される乳剤あるいはローション剤などの乳濁剤、外用チンキ剤、経粘膜投与用液剤などが挙げられる。この製剤は通常用いられる希釈剤としては、例えばエタノール、油分、乳化剤などを含む。半固体製剤としては、例えば油性軟膏、親水性軟膏などの軟膏剤が挙げられる。この製剤は通常用いられる基剤あるいは担体として、例えば、水、ワセリン、ポリエチレングリコール、油分、界面活性剤などを含む。半固体あるいは固体製剤としては、例えば硬膏（ゴム膏、プラスターなど）、フィルム剤、テープ剤、あるいはパップ剤などの経皮投与用または経粘膜（口腔内、経鼻）投与用の貼付剤などが挙げられる。この製剤は通常用いられる基剤あるいは担体として、例えば天然ゴム、ブタジエンゴム、SBR、SISなどの合成ゴムなどのゴム系高分子、ゼラチン、カオリン、酸化亜鉛などの泥状化剤、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウムなどの親水性高分子、アクリル樹脂、流動パラフィンなどの粘着付与剤、水、その他の油分、界面活性剤を含む。これらの製剤は、さらに安定化剤、溶解補助剤、経皮吸収促進剤のような補助剤、あるいは芳香剤、防腐剤などの添加剤などを用いても良い。

【0083】本発明の抗酸化剤は本抽出物を有効成分として含有する。有効成分とは目的とする機能が発揮される程度に該抽出物を含むことを示す。その含量は、特に制限されないが、目的とする機能の度合い、使用態様、使用量、該抽出物の濃縮や分画・精製度合い等により適宜調整することができ、例えば0.01～100質量%、好ましくは0.1～99.9質量%、更に好ましくは0.5～99.5質量%である。本抽出物はオリーブ植物および／またはオリーブ油製造工程で得られる生成物を水および／または有機溶媒で抽出処理して得ることができ、更に該抽出物を濃縮処理および／または分画・精製処理することで、効果が強化された活性酸素除去剤を得ることができる。該活性酸素除去剤は、人体やその他飲食物、医薬品、肥料、飼料や皮膚外用剤に使用することができる。また、経口等により内服することも、皮膚等に塗布することもできる。

【0084】本発明の抗酸化剤は、常法にしたがって経口、非経口の製品に配合することができ、飲食物、皮膚外用剤、医薬品、医薬部外品、飼料、餌料、農薬等の様

々な分野で利用することができる。例えば、飲食物に配合した場合には、生体内抗酸化効果および酸化防止効果を有する飲食物を提供することができる。この飲食物は例えば、風味劣化・変色抑制等の酸化防止効果が期待でき、かつ、生活習慣病予防等の効果が期待できる。生活習慣病予防等の効果からは、健康食品、栄養食品等として用いられることも期待できる。さらには、該抽出物の濃縮等の条件を調整することで、これを含有する飲食物を継続的に摂取することにより、更なる効果を発揮する機能的な飲食物を提供することができる。その他、家畜、魚類の飼料、餌料に利用することができ、特に魚類の餌料は水分を必須とするものが多く放置すると酸化劣化し易いものがあり、また、水中投下するので水と接し易いが、これらを改善した餌料等を提供することができる。また、併せて、一部には飼育の困難な鑑賞用や養殖等の魚類も存在するが、本発明の抗酸化剤を用いた餌料等は生体内抗酸化効果等の効果を有することから、これらの育成・生存率の向上に寄与する餌料等を提供することができる。

【0085】本発明の抗酸化剤を人体やその他飲食物、医薬品、肥料、飼料や皮膚外用剤に使用することにより、抗酸化効果、特に製品の保存安定性の向上効果等の優れた酸化防止効果や、各種疾病予防効果や抗老化効果等の優れた生体内抗酸化効果が得ることができる。さらに、オリーブ植物から容易に得ることができ、また、オリーブ油の製造工程中に発生する通常は廃棄されている生成物からも好適に得ることができることから、コスト面からみても、資源の有効活用という面からみても好ましい。

【0086】

【実施例】次に、実施例を挙げ、本発明をさらに説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0087】実施例1～17、比較例1において各種抽出物を製造した。また、収率については下記の<式3>で求めた。

【0088】

【数3】<式3> 抽出物の収率＝本抽出物の質量（注1）÷抽出前の原料の質量（注2）

注1：凍結乾燥により乾燥させた後、質量（g）を測定
注2：本抽出物を、溶剤等で抽出する直前の果実、粕、種子の質量（g）を測定

【0089】実施例1

国産のオリーブ（*Olea europaea* L.）の乾燥果実（種子を含む）1kgを破碎し、3Lのヘキサンを加え3時間抽出した。これを4度繰り返した脱脂果実について、種子を除去した後、粉碎し、再度5倍量のヘキサンで3時間抽出することで、完全に油分を除去した脱脂粕22.9gを得た。この脱脂粕に10倍量のエタノール含量が60質量%の含水エタノール水溶液を加

え、室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物112.7gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性およびヒドロキシラジカル消去活性の評価を行った。その結果を表1および表2に示す。

【0090】実施例2

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量のエタノール含量が80質量%の含水エタノール水溶液を加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物79.7gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0091】実施例3

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量のエタノール含量が70質量%の含水エタノール水溶液を加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物97.8gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0092】実施例4

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量のエタノール含量が50質量%の含水エタノール水溶液を加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物111.1gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0093】実施例5

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量のエタノール含量が40質量%の含水エタノール水溶液を加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物112.9gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0094】実施例6

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量のエタノール含量が20質量%の含水エタノール水溶液を加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物110.6gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0095】実施例7

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量の無水エタノールを加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物13.5gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0096】実施例8

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量の水を加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出

した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物118.2gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0097】実施例9

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量のアセトン含量が60質量%の含水アセトンを加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物51.5gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0098】実施例10

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量のTHF含量が60質量%の含水THFを加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物54.3gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0099】実施例11

実施例1と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量のAN含量が60質量%の含水ANを加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物49.6gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0100】実施例12

種子を除去したオリーブの乾燥果実1kgを破碎し、その破碎した果実に、20倍量のエタノール含量が60質量%の含水エタノール水溶液を加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物238.5g抽出物にヘキサン1.5L、水1.5Lを加えてよく攪拌した後、分液された水相を濃縮乾固して、分配抽出物126.4gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0101】実施例13

オリーブの種子500gを破碎し、その破碎した種子に10倍量のエタノール含量が60質量%の含水エタノール水溶液を加え、同様に室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物42.0gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0102】実施例14

イタリア産のオリーブ(*Olea europaea* L.)を搾油し、得られた圧搾残渣1kgに、3Lのヘキサンを加え3時間抽出した。これを4度繰り返した脱脂残渣(884g)について、種子および夾雑物をフルイで適当に除去して、脱脂粕196gを得た。この脱脂粕に10倍量のエタノール含量が60質量%の含水エタノール水溶液を加え、室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物1

9. 2 gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0103】実施例15

実施例14と同様の方法により得た脱脂粕に、10倍量のエタノール含量が70質量%の含水エタノール水溶液を加え、室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物17.4 gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0104】実施例16

イタリア産のオリーブ (*Olea europaea* L.) を搾油し、得られた圧搾残渣1 kgに、3 Lのヘキサンを加え3時間抽出した。これを4度繰り返した脱脂残渣884 gについて、種子等を除去すること無く、これを粉砕し、粉砕脱脂残渣873 gを得た。この粉砕脱脂残渣に10倍量のエタノール含量が60質量%の含水エタノール水溶液を加え、室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物39.5 gを得た。得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0105】実施例17

実施例16と同様にして得た粉砕脱脂残渣に、10倍量のエタノール含量が60質量%の含水エタノール水溶液を加え、室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、得られたろ液を完全に脱エタノールして得られた抽出物の水層部分に、水不溶分回収の効率を上げることを目的として、総量が830 gになるように水を加え、室温で1時間、激しく攪拌した。全量を遠心分離で処理して沈殿分を除去した後、デカンテーションにより回収した上澄みを乾燥して濃縮物22.9 gを得た。濃縮して得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った結果を表1に示す。

【0106】比較例1

乾燥ゴマ種子1 kgを破砕し、3 Lのヘキサンを加え3時間抽出した。これを4度繰り返したゴマ脱脂粕526.4 gを得た。このゴマ脱脂粕に10倍量のエタノール含量が60質量%の含水エタノール水溶液を加え、室温で激しく攪拌しながら3時間抽出した。全量をろ過後、ろ液を濃縮乾固して抽出物58.2 gを得た。このゴマ種子から得られた抽出物に関し、スーパーオキシド消去活性およびヒドロキシラジカル消去活性の評価を行った。その結果を表1および表2に示す。

【0107】比較例2として、合成のスーパーオキシド消去活性を有する合成の抗酸化剤であるBHAに関し、スーパーオキシド消去活性の評価を行った。結果を表1に示す。

【0108】以下に、活性酸素除去機能に関して、スーパーオキシド消去活性、ヒドロキシラジカル消去活性についての評価方法および評価結果を示す。

【0109】＜スーパーオキシド消去活性の評価方法＞

スーパーオキシド消去活性の評価は、金田尚志、上田伸夫編集、「過酸化脂質実験法」、第136-154頁、医歯薬出版(株)1993年発行に記載されている方法に従い、以下のように測定した。炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH10.2)1.2 mLに1 mg/mLのEDTA溶液50 μL、1.5 mg/mLウシ血清アルブミン(BSA)溶液50 μL、0.6 mg/mLニトロブルーテトラゾリウム(NBT)溶液50 μL、0.5 mg/mLキサンチン溶液50 μL、および、オリーブ抽出物を所定の濃度で溶解させた「試料溶液」0.1 mLを加え混和した後、25℃にて10分放置する。これに0.1 unit/mLキサンチンオキシダーゼ(XOD)溶液50 μLを加え攪拌し、25℃にて20分間放置した。1 mg/mL塩化銅溶液50 μLを加え酵素反応を停止させた後、560 nmの吸光度値(A)を測定し、「試料溶液」の代わりに同量の「緩衝液」を加えた物を対照溶液として同様に吸光度値(B)を測定した。また、塩化銅溶液と、「試料溶液」または「緩衝液」の添加順を逆にしたもの、それぞれ試薬ブランクとして同様に吸光度を測定し、それぞれの値をa、bとした。一方、比較用の抗酸化剤としては、市販の抗酸化剤であるブチルヒドロキシアニソール(BHA)を用いた。BHAについては上記の測定方法を、以下の点を変更して吸光度値(A)測定した。すなわち、炭酸ナトリウム緩衝液(pH10.2)は1.25 mLの添加量、メタノールを用いて所定の濃度で溶解した「BHA溶液」は50 μLの添加量とし、また、XOD溶液は0.2 unit/mLの濃度で調製したものをを用いた。「BHA溶液」の代わりに同量の「メタノール」を添加したものを対照溶液として、吸光度値(B)を測定した。また、塩化銅溶液と「BHA溶液」または「メタノール」の添加順を逆にしたもの、それぞれ試薬ブランクとして同様に吸光度値を測定し、それぞれの値をa、bとした。そして、以下の<式4>からスーパーオキシドの消去活性を算出した。ここで、式中の(C)は測定溶液系中の試料濃度を示しており、スーパーオキシドが消去されることにより吸光度値が0.1減少する活性を1単位(1 unit)と定義した。この活性値が高いほどスーパーオキシド消去作用が強いことを示している。

【0110】

【数4】<式4> スーパーオキシド消去活性(unit/(mg/mL)) = ((B-b) - (A-a)) / (C × 0.1)

【0111】また、スーパーオキシド消去活性収量指数を前記の<式2>により算出した。

【0112】

【表1】

10

20

30

40

	原料	抽出液	収率 (%)	スーパーオキシド 消去活性 [unit/(mg/mL)]	スーパーオキシド 消去活性 収量指数
実施例1	脱脂粕①	60%:含水エタノール	49.2	60	2952
実施例2	脱脂粕①	80%:含水エタノール	34.8	31.2	1087
実施例3	脱脂粕①	70%:含水エタノール	42.7	68	2904
実施例4	脱脂粕①	50%:含水エタノール	48.5	58	2813
実施例5	脱脂粕①	40%:含水エタノール	49.3	58.3	2775
実施例6	脱脂粕①	20%:含水エタノール	48.3	33.6	1823
実施例7	脱脂粕①	100%:無水エタノール	5.9	25.9	153
実施例8	脱脂粕①	水	51.8	24.8	1281
実施例9	脱脂粕①	60%:含水アセトン	22.5	17.1	385
実施例10	脱脂粕①	60%:含水THF	23.7	18.9	448
実施例11	脱脂粕①	60%:含水AN	21.7	14.1	306
実施例12	乾燥果実から種子を除き、脱脂したもの	60%:含水エタノール	12.8	42.4	534
実施例13	乾燥種子粉砕物	60%:含水エタノール	8.4	26.4	213
実施例14	脱脂粕②	60%:含水エタノール	9.8	23.4	229
実施例15	脱脂粕③	70%:含水エタノール	8.9	29.5	263
実施例16	脱脂粕③	60%:含水エタノール	4.6	22.8	103
実施例17	実施例18の濃縮物	水可溶分回収	2.6	39.5	103
比較例1	ゴマ脱脂粕	60%:含水エタノール	11.1	7	77
比較例2	BHA			26	—

抽出液の%は溶剤の含量を示し、質量%を意味する。

脱脂粕①: 国内産のオリーブの乾燥果実から種子を除き、脱脂したもの
脱脂粕②: イタリア産のオリーブの圧搾残渣から種子を除き、脱脂したもの
脱脂粕③: イタリア産のオリーブの圧搾残渣を脱脂したもの(種子含む)

【0113】表1から、本抽出物は、非常に強いスーパーオキシド消去活性を有することがわかる。特に、水、無水アルコール、含水アルコールを用いて抽出した場合、本抽出物は天然の抽出物であるにもかかわらず、代表的な合成抗酸化物質であるBHAと比較しても、同等～2倍程度の消去活性を示している。単なる抽出物の段階でも、非常に強いスーパーオキシド消去活性を有することがわかる。さらに、本抽出物は収率が高いことから、スーパーオキシド消去活性収量指数は更に高いものとなっている。この指数から見ても分かる通り、同じ条件の天然原料から、より多くの、強い活性酸素除去機能を有する抽出物を得ることができることがわかる。

【0114】<ヒドロキシラジカル消去活性の評価方法>ヒドロキシラジカル消去活性は以下のように測定した。本実施例で用いた反応系はフェントン反応にてヒドロキシラジカルを発生させ、そのヒドロキシラジカルと脂肪酸との反応により生じるマロンジアルデヒド(MDA)をチオバルビツール酸と反応させたときに生成するチオバルビツール酸-MDAアダクトを測定する方法に基づいている。すなわち所定の濃度で溶解させた測定対象物を、リノール酸溶液(2mg/mL)およびドデシル硫酸ナトリウム(SDS, 2mg/mL)を含む30mMのTris塩酸緩衝液(pH7.4)0.46mL*

*で溶解し、2.5mM過酸化水素溶液0.02mLおよび2.5mM塩化鉄(II)溶液0.02mLを加え、5h、37℃で加温した。本抽出物、濃縮物および精製物を含まず同様に反応したものを対照とした。加温後、10mg/mLブチルヒドロキシルトルエン(BHT)エタノール溶液0.01mLを加えた。TBA12mgおよびSDS16.2mgを蒸留水2.3mLに溶解し、これに20%(v/v)酢酸緩衝液(pH4.0)1.5mLおよび前記反応液0.2mLを加え、95℃で1時間加温した。放冷後、(532nm)における吸光度を測定した。各試料を含む反応液の吸光度をD、対照の吸光度をEとし、そのヒドロキシラジカル消去率を以下の<式5>から算出した。ヒドロキシラジカル消去率が高い方がヒドロキシラジカル消去作用が強いことを示している。

【0115】

【数5】<式5> ヒドロキシラジカル消去率(%) = $\{1 - (E - D) / E\} \times 100$

【0116】上記ヒドロキシラジカル消去率(%)が50%となる測定対象物の濃度を比較し、ヒドロキシラジカル消去活性の強さを比較する。

【0117】

【表2】

	原料	抽出液	収率 (%)	ヒドロキシラジカル消去率が 50%になる検体濃度 (mg/mL)
実施例1	脱脂粕①	60%:含水エタノール	49.2	0.69
比較例1	胡麻脱脂粕	60%:含水エタノール	11.1	0.65

抽出液の%は溶剤の含量を示し、質量%を意味する。

脱脂粕①: 国内産のオリーブの乾燥果実から種子を除き、脱脂したもの

【0118】表2から、本抽出物はヒドロキシラジカル消去活性に関しても、ヒドロキシラジカル消去活性が強いとされているゴマ種子からの抽出物と比較して、同程度の消去活性を示している。また、このゴマ種子からの抽出物のスーパーオキシド消去活性と本抽出物のスーパ

ーオキシド消去活性を比較すると、約8倍～9倍である。このように本抽出物は、強いスーパーオキシド消去活性とヒドロキシラジカル消去活性の両方を併せ持つ優れた活性酸素除去機能を有する抽出物であることがわかる。

【0119】次に、本抽出物を、実際に製品や動物、ヒトに適用した場合の効果について、得られる抗酸化効果の評価方法および評価結果を示す。

【0120】まず、抗酸化効果については、実際の食品に配合した時の酸化防止効果と、実際に動物に摂取させた時の生体内抗酸化効果について評価方法および評価結果を示す。

【0121】実施例18 クッキーを用いた酸化防止効果の評価

下記配合にて原料を混合し、1個あたり10gになるように分割し、180℃で15分焼き、クッキーを製造した。なお、対照には、本抽出物を配合せずに製造した。

(原料)	(配合量)
(1) マーガリン	70g
(2) 砂糖	40g
(3) 食塩	0.7g
(4) 全卵	20g
(5) 薄力粉	100g
(6) 実施例17の抽出物	1g

【0122】作製直後のクッキーの一定質量について、常法に則って、ヘキサンにて脂質を抽出しヘキサンを溜去した後、その脂質のPOVを測定したところ、対照のクッキーのPOVは2.1、本抽出物を配合したクッキーのPOVは2.3であった。これらのクッキーを60℃、暗所で18日間保存後、同様にしてPOVの測定を行なったところ、対照のクッキーのPOVは31.7に*

*まで上昇していたのに対し、本抽出物を配合したクッキーのPOVは7.5であった。また、同様にして得られたクッキーを、60℃、暗所で18日間保存後、試食した。その結果、対照のクッキーはかなりの酸化劣化臭を有していたのに対し、本抽出物を配合したクッキーは、保存後も良好な風味を有していた。

【0123】この結果から、本抽出物は酸化防止効果を有し、製品等の保存安定性を向上させる効果を有することがわかった。

【0124】各実施例で得られたオリーブ抽出物を、実際に動物に摂取させた時の生体内抗酸化効果について、その評価方法および評価結果を示す。

【0125】実施例19 ラットを用いた生体内抗酸化効果の評価

6週齢のウィスター系雄ラット（日本エスエルシー）7匹を1試験区とし、各試験区用の粉末精製飼料を、4週間水とともに自由摂取させた。各試験区用飼料は、下表3の飼料組成の通りに作製した。飼料成分の酸化劣化を防ぐために、飼料は2日に1回交換した。試験食投与4週間目の午前9時より絶食させ、午後2時より各ラットの肝臓を採取した。肝臓中の抗酸化能を下記AOA法を用いて測定し、検体の各オリーブ抽出物の生体内抗酸化作用を評価した。

【0126】

【表3】

	第1群	第2群	第3群	第4群	第5群	第6群	第7群
コーンスターチ	52.95	52.95	52.95	52.95	52.95	52.95	52.95
カゼイン	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
グラニュー糖	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
精製ダイズ油	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
セルロース	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
ミネラル混合(AIN-93G)	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50
ビタミン混合(AIN-93G)※	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
レシチン	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
重酒石酸コリン	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
実施例1のオリーブ抽出物		1.00	0.10	0.01			
実施例14のオリーブ抽出物					0.10		
実施例16のオリーブ抽出物						0.10	
実施例17のオリーブ抽出物							0.10

※；トコフェロールを除いたもの。

【0127】<AOA法（脂質過酸化抑制率の測定法）>基質として、牛の脳のリン酸緩衝液の摩砕物を用意する。これに、後述する方法で採取した肝臓の摩砕物を添加し、37℃で1時間保持して、脂質の酸化を進行させる。この反応液の除タンパク上清にTBA（チオバルビツール酸）溶液を添加して攪拌し、95℃で、15分間保持する。この反応液の吸光度を分光光度計により測定

する。吸光度の値の大小と、過酸化脂質濃度の大小は相関している。検体（各オリーブ抽出物）添加群での吸光度と、対照群の吸光度とを比較し、検体（各オリーブ抽出物）の脂質過酸化抑制率（％）を求める。

【0128】上記方法にて、生体内抗酸化効果を評価した。この結果を表4に示す。

【0129】

【表4】 肝臓脂質過酸化抑制率

	肝臓脂質過酸化抑制率(%)
1, 無添加(対照)群	0
2, 実施例1のオリーブ抽出物1%添加群	85.2
3, 実施例1のオリーブ抽出物0.1%添加群	64.7
4, 実施例1のオリーブ抽出物0.01%添加群	41.5
5, 実施例14のオリーブ抽出物0.1%添加群	53.7
6, 実施例16のオリーブ抽出物0.1%添加群	55.1
7, 実施例17のオリーブ抽出物0.1%添加群	61.3

【0130】表4から、本抽出物は、経口摂取により、* 効果に応じて、含量を増減すればよいことも分かった。生体内においてその抗酸化効果を発揮し、生体内酸化の た。

結果生じる過酸化脂質の生成を抑制することが確認され 10 【0131】

た。また、この効果は含量依存的であることから、求め*

実施例20 錠剤(抗酸化剤の製造例-1)

(1) 実施例17の抽出物	10.0mg
(2) 乳糖	94.0mg
(3) トウモロコシデンプン	34.0mg
(4) 結晶セルロース	20.0mg
(5) ステアリン酸マグネシウム	1.0mg

上記配合比率にて、まず、(1)～(4)までをよく混 ※ を打錠して錠剤を得た。

合した後、(5)を加えてさらに混合した。この混合物※ 【0132】

実施例21 散剤(抗酸化剤の製造例-2)

(1) 実施例17の抽出物	10.0mg
(2) 乳糖	981.0mg
(3) ヒドロキシプロピルセルロース	4.0mg
(4) 軟質無水ケイ酸	5.0mg

上記配合比率にて、まず、(1)(2)をよく混合した ★ (4)を加えてさらによく混合して、散剤を得た。

後、(3)を加えて造粒する。これを乾燥後に製粒し、★ 【0133】

実施例22 カプセル剤(抗酸化剤の製造例-3)

(1) 実施例17の抽出物	10.0mg
(2) 乳糖	70.0mg
(3) トウモロコシデンプン	38.0mg
(4) ステアリン酸マグネシウム	2.0mg
(5) カプセル	260.0mg

上記配合比率にて、まず、(1)～(4)をよく混合して得た混合末を、(5)に充填してカプセル剤を得た。

【0134】実施例20で得られた錠剤を、実際に人に摂取した際の生体内抗酸化効果について、過酸化脂質生成抑制効果の評価方法と評価基準を以下に示す。

【0135】実施例23 人体に対する生体内抗酸化効果の評価

実施例20で得られた錠剤を人に用いた際の生体内抗酸化効果の評価を、健康な30代男性30人を対象にブラインドで行った。すなわち、30代男性30人を、試験前の血中過酸化脂質濃度の平均が均等になるように15人ずつの2区に分け、それぞれを試験食区および対照食区とし、試験食区の人には実施例17のオリーブ抽出物を配合した錠剤を、また、対照区の人には実施例17の錠剤でオリーブ抽出物を配合していない錠剤を、毎食(朝、昼、晩)と同時に摂取させた。試験は30日間行い、10日毎に血液を採取した。血液からは遠心分離によって血清を調製し、測定まで-80℃で保管した。下 50 す。

記方法にて、血清中過酸化脂質(PCOOH)量を測定し、得られた結果から、実施例20で得られた錠剤の生体内抗酸化効果について評価した。

【0136】<過酸化脂質(PCOOH)の測定法>血清中のPCOOH量の測定は、大島らの方法に準じて行った(Lipids, 31, 1091, 1996)。すなわち、血清に、20ppmBHTを含むクロロホルム-メタノール(2/1(v/v))溶液およびNBD-PCクロロホルム溶液を添加し、これをよく振とうした後、遠心分離してクロロホルム層を回収した。溶媒を溜去した後、HPLCに用いる移動相(クロロホルム:メタノール:水=9:50:1)に再溶解したものを、ジフェニルピレニルホスフィン(DPPP)を反応試薬としたポストカラムHPLCに供した。

【0137】上記の評価試験にて、人における生体内抗酸化効果を評価した。各区における血清中過酸化脂質(PCOOH)量の経時変化の結果について、表5に示

【0138】

【表5】 血清中過酸化脂質（PCOOH）量の経時変化

血清中脂質過酸化率(%)	
1. 対照区(抽出物無添加の錠剤)	
0日後	0
10日後	1.4
20日後	0.8
30日後	1.2
2. 試験食区(実施例20の錠剤)	
0日後	0
10日後	17.1
20日後	51.9
30日後	68.2

【0139】表5から、本発明のオリーブ抽出物を含有する抗酸化剤は、人が摂取した場合、生体内においてその抗酸化効果を発揮し、生体内抗酸化剤として作用し、生体内酸化の結果生じる過酸化脂質の生成を大幅に抑制することが確認された。

【0140】

【発明の効果】本発明によれば、オリーブ植物等から活性酸素除去機能を有する抽出物を含有する、優れた抗酸化効果を有する抗酸化剤を得ることができる。本発明に*

*よれば、強力なスーパーオキシド消去またはヒドロキシルラジカル消去等の活性酸素除去機能を有する天然の抽出物を含有する抗酸化剤を、安定的に提供することができる。本発明の抗酸化剤は微量で強い抗酸化効果を有しており、該抗酸化剤を人体やその他飲食物、医薬品、肥料、飼料や皮膚外用剤等を使用することにより、抗酸化効果、特に製品保存安定性の向上効果等の優れた酸化防止効果や、各種疾病予防効果や抗老化効果等の優れた生体内抗酸化効果を得ることができる。また、本発明によれば、本発明の抗酸化剤に用いる該抽出物を、収率よく得ることができるため、単位原料あたりに得ることができる効果の総量（総指数）が非常に多い。さらに、オリーブ植物から容易に得ることができ、また、オリーブ油の製造工程中に発生する通常は廃棄されている生成物からも好適に得ることができることから、安定的な供給面やコスト面からみても、資源の有効活用という面からみても好ましい。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F1

テーマコード(参考)

A61P 39/06

A61P 39/06